

⑬ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑪ **DE 3720736 A1**

⑳ Aktenzeichen: P 37 20 736.9
㉑ Anmeldetag: 23. 6. 87
㉒ Offenlegungstag: 5. 1. 89

⑤ Int. Cl. 4:
C07F 5/02
G 01 N 33/68
C 09 B 69/10
C 09 B 62/78
// C08B 62/825

DE 3720736 A1

⑦① Anmelder:
Schleicher, Erwin, Dr., 8000 München, DE

⑦② Erfinder:
gleich Anmelder

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤④ Verfahren, Reagenzien und Ausrüstung zur einfachen Bestimmung von nicht-enzymatisch glykosylierten Proteinen in Körperflüssigkeiten

Es werden Verfahren und Mittel zur Bestimmung von nichtenzymatisch glykosylierten Proteinen in biologischen Flüssigkeiten vorgeschlagen. Das Meßprinzip beruht auf der spezifischen Esterbildung von glykosylierten Proteinen mit bevorzugt im UV-vis-Spektrum absorbierenden oder fluorophoran Borsäurederivaten. Die Messung erfolgt entweder nach Trennung der gebundenen von den freien Borsäurederivaten oder direkt im Reaktionsmedium. Die Borsäureesterbildung kann auch als spezifischer Leerwert für unspezifische Testverfahren zur genauen Bestimmung der glykosylierten Proteine herangezogen werden. Ferner werden neue Borsäurederivate und ihre Herstellung sowie ein Verfahren zur Glycosylierung von Proteinen natürlichen Ursprungs und von synthetischen, lysinhaltigen Polyaminosäuren gezeigt.

DE 3720736 A1

US 37 20 736

Patentansprüche

1. Verfahren zur Bestimmung der glycosylierten Proteine, die in biologischen Flüssigkeiten oder in aus biologischem Material gewonnenen Fluiden enthalten sind, dadurch gekennzeichnet, daß diese Flüssigkeiten oder Fluide im alkalischen Milieu bei pH 8 bis 12 mit substituierten, hinreichend wasserlöslichen Arylboronsäuren, die im UV-vis-Bereich ein Absorptionsmaximum besitzen oder mit entsprechenden fluoreszenzmarkierten Arylboronsäuren, deren Fluoreszenzpolarisation sich bei der Bindung an die glycosylierten Proteine ändert, im Überschuß versetzt und die Arylboronsäure mit den glycosylierten Proteinen zum entsprechenden cis-Diol-Ester umgesetzt werden und daß die Konzentration A 1 der gebundenen Diol-Ester in an sich bekannter Weise gemessen wird, wobei gegebenenfalls zusätzlich eine Blindwertbestimmung A 2 vorgenommen wird, indem zusätzlich eine identische Probe mit Borsäure oder einem nichtfärbenden Borsäurederivat umgesetzt wird und die Differenz der Konzentrationen A 1 minus A 2 an gebildeten cis-Diol-Estern in beiden Proben gemessen oder berechnet wird.

2. Verfahren zur Bestimmung der glycosylierten Proteine, die in biologischen Flüssigkeiten oder in aus biologischem Material gewonnenen Fluiden enthalten sind, insbesondere nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß zur Blindwertbestimmung eine zweite, identische Probe mit Borsäure oder einem nichtfärbenden oder im blauen UV nicht absorbierenden Borsäurederivat umgesetzt oder eine identische, jedoch mit Boranat reduzierte Probe nach dem Verfahren nach Anspruch 1 gemessen und durch die Differenzbildung ein Differenzmeßwert bestimmt und dieser Wert zu dem mit zwei Standardproben ST1 und ST2 in gleicher Weise erhaltenen Differenzwert in die Beziehung $(A 1 - A 2) : (ST1 - ST2) = \text{gesamte Menge an glycosylierten Proteinen} : \text{kalibrierter Standard}$ gesetzt wird.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß man vor der Endablesung vorhandene freie, überschüssige Phenylboronsäurederivate abtrennt und dann die Endablesung vornimmt oder wahlweise die gebildeten cis-Diol-Ester aus der Reaktionsmischung abtrennt und diese dann bestimmt.

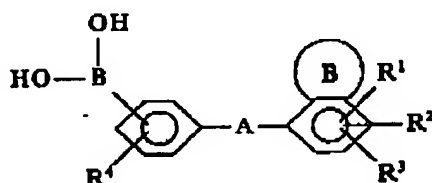
4. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Differenz der Reduktionskraft zwischen Probenhaupt- und Probenblindwert A 1 bzw. A 2 mit den entsprechenden Werten ST1 und ST2 der Standardprobe gemessen wird und die Konzentration der cis-Diol-Ester in der Probe daraus berechnet wird.

5. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Differenz der Konzentration durch Zugabe eines Überschusses einer cis-Diol enthaltenden Verbindung, die Borsäure oder Arylboronsäure bindet, zur Blindwertprobe A 2 und zur Standardblindwertprobe ST2 bestimmt wird.

6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß als cis-Diol enthaltene Verbindung Fruktose, Sorbit oder Diethanolamin verwendet wird.

7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß als Standardprobe glycosyliertes Serumalbumin humaner oder tierischer Herkunft oder in vitro glycosylierte polymere lysinhaltige Polyaminosäuren mit definiertem Glucosegehalt verwendet werden.

8. Mittel zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 1 bis 7 in Form von substituierten Arylboronsäuren der allgemeinen Formel I



(I)

worin

—A— die Gruppen —N=N— oder —NH—C(=S)—NH bedeutet, R¹ R² und R³, die gleich oder verschieden sein können, H, Cl, F, NO₂, Methoxy, Ethoxy oder eine hydrophilisierende Gruppe, insbesondere OH, SO₃H, COOH, NH₂ oder eine niedere Alkylgruppe mit bis zu 4, insbesondere 2 C-Atomen bedeuten, wobei jedoch höchstens zwei der Reste R¹ bis R³, H, Cl, F, NO₂ oder Methoxy oder Ethoxy bedeuten können und bei niederen Alkylresten mindestens einer eine hydrophilisierende Gruppe, wie oben definiert, enthält und dabei auch einer der Reste R¹ bis R³ eine bis dreifach mit R¹, R², R³ substituierte Diazophenylgruppe sein kann und R⁴ NH₂ oder Wasserstoff bedeutet und B gegebenenfalls ein 1- bis 3facher hydrophil substituierter ankondensierter Benzolring sein kann.

9. Mittel zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 1 bis 7, in Form von lysinhaltigen glycosylierten polymeren Aminosäuren oder Proteinen mit definiertem Glucosegehalt, dadurch gekennzeichnet, daß sie erhältlich sind, indem man ein Protein oder eine polymere Aminosäure, die mindestens eine Lysineinheit enthalten und ein Molekulargewicht von 25 bis 150 kD aufweisen, bei pH 5 bis 11 mit Glucose und NaN₃ versetzt, die Mischung anschließend für einige Stunden bis einige Tage bei einer Temperatur bis zu 55°C inkubiert und dann gegen glucosefreien Inkubationspuffer dialysiert.

10. Mittel nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß es als Protein Serumalbumin humaner oder tierischer Herkunft vom MG ca. 67 000 aufweist.

11. Mittel nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß es ein Peptid oder eine polymere Aminosäure vom Molekulargewicht von ca. 60 000 bis 70 000 aufweist.

12. Mittel nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß es als synthetische polymere Aminosäure Poly-D-Lysin, Poly-(D-Glutamat, D-Lysin) 6 : 4 oder Poly-(Glutamat, Lysin, Tyrosin) 6 : 3 : 1 mit einem Molekulargewicht von 25 bis 150 kD, insbesondere 60—70 kD, aufweist.

13. Kits zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 1 bis 7, umfassen allein in getrennten Behältern oder getrennt, jedoch in einem einzigen Behälter vereinigt, folgende Reagenzien:

- eine dosierte Menge einer Arylboronsäure nach Anspruch 8, gegebenenfalls in Lösung auf pH 8 bis 11 gepuffert,
- einen alkalischen Puffer von bekanntem pH-Wert im Bereich von 8 bis 11,
- eine bekannte Menge eines Borats, dessen Borsäureester bei der Bestimmung in der Indikatorreaktion nicht erfasst wird, gegebenenfalls in Lösung gepuffert auf pH 8 bis 11,
- Kohle-Dextransuspension,
- eine bekannte Menge an Standardprotein mit bekanntem Glucosegehalt oder einer solchen Polya-
minosäure sowie gegebenenfalls,
- Nitrobluetetrazoliumsalz, gegebenenfalls in verdünnter Lösung,
- Natriumborhydrid,
- Fruktose, Sorbit und/oder Diethanolamin.

14. Kit nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß die Arylboronsäure auf pH 9,2 gepuffert ist, das nicht bei der Indikatorreaktion erfaßte Borat Borsäure ein Alkaliborat oder Ammoniumborat oder -polyborat ist und der Puffer ein pH von 10 bis 10,5 aufweist, und der Kit zusätzlich 3-Nitrophenylboronsäuren in dosierter Menge und eine Anzahl Filterpapiere aufweist.

15. Anwendung des Verfahrens nach Anspruch 1 bis 7 und der Mittel nach Anspruch 8 und 9 zur Bestimmung von Proteinen, die andere reduzierende Zuckerreste als Glucose in der Ketoaminform gebunden enthalten.

Beschreibung

Seit der Einführung des Insulins sind die akuten Komplikationen, an denen die Diabetiker in der Vorinsulinaera starben, seltener geworden. Bei den heutigen Therapiemöglichkeiten wird die Lebenserwartung des Diabetikers vor allem durch die begleitenden Spätschäden bestimmt. Obwohl die Pathogenese der Spätschäden (Retinopathie, Nephropathie, Neuropathie und Atherosklerose) nicht im einzelnen aufgeklärt ist, zeigen epidemiologische Studien, daß schlechte Stoffwechseleinstellung frühzeitiger und vermehrt zu Spätkomplikationen führt als gute Stoffwechselführung. Aus diesem Grunde ist es wichtig, einen Parameter zu haben, mit dessen Hilfe man den mittleren Blutzuckerspiegel von diabetischen Patienten beurteilen kann. Die meisten der bestehenden Methoden verwenden die direkte Glucosebestimmung im Blut oder im Urin. Allerdings schwankt der Blutzuckerspiegel sehr stark im Tagesverlauf und hängt zudem u. a. von der Ernährung und der körperlichen Tätigkeit der diabetischen Patienten ab. Ebenso unterliegt die Harnglucose einer Reihe von Einflüssen, die unabhängig von der Stoffwechseleinstellung des Diabetikers sind.

Vor ca. 10 Jahren wurde entdeckt, daß Glucose an das Hämoglobin im Blut in Abhängigkeit vom Blutglucosespiegel irreversibel gebunden wird. Die Bestimmung des entstehenden nichtenzymatisch glycosylierten Hämoglobins erlaubt nun eine Beurteilung des Blutzuckerspiegels der letzten drei Monate. Entsprechend dem Hämoglobin werden auch die anderen Serumproteine in Abhängigkeit vom Blutglucosespiegel nichtenzymatisch glycosyliert (zur Chemie vergleiche Schema 1). Albumin, mit einer Halbwertszeit von 20 Tagen macht den Hauptanteil an glycosylierten Plasmaproteinen aus. Die Bestimmung von glycosylierten Plasmaproteinen eignet sich deshalb zur Beurteilung der Stoffwechselführung über einen mittelfristigen Zeitraum von etwa 3 Wochen. Da mehrfach gezeigt wurde, daß zwischen glycosyliertem Albumin und glycosyliertem Serumprotein eine sehr enge Beziehung besteht, kann die Isolierung des Albumins aus Serum unterbleiben.

Zur Bestimmung von glycosylierten Serumproteinen wurden mehrere Testprinzipien beschrieben:

1. Die Bestimmung mit Hilfe des durch schwachsaure Hydrolyse entstehenden Hydroxymethylfurfurals, das durch die Thiobarbitursäurereaktion gemessen wird, ist sehr störanfällig und zeitaufwendig (Dolhofer R. und Wieland O. H. Clin.Chim.Acta (1981) 112, 197—204) (DE-OS-33 23 837 A1).
2. Die Bestimmung mit Hilfe der Affinitätschromatographie an Borsäuregelen ist nur für das glycosylierte Hämoglobin quantitativ, nicht aber für die glycosylierten Serumproteine (nur ein geringer Anteil des glycosylierten Albumins wird retiniert) (Brownlee M. et al. Diabetes (1980) 29 1044—1047), (Gould et al. Ann.Clin.Biochem. (1984) 21, 16—21) (EP-A-64 551).
3. Bestimmung mit Hilfe eines Redoxindikators im alkalischen Milieu (Fruktosamin-Test) (Johnson et al. Clin.Chim.Acta (1982) 127, 87—95) (00 85 263 A1).
- Diese einfache und billige Bestimmung erfaßt als Reduktionsmethode auch unspezifisch andere Serumbestandteile, deren Menge von Probe zu Probe variieren kann.
4. Bestimmung des durch stark saure Hydrolyse von Serumproteinen entstehenden Furosins mittels Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC) (Schleicher E. und Wieland O. H. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. (1981) 19, 81—87).
- Für die Durchführung dieser präzisen und richtigen Methode ist man auf eine teure Hochdruckflüssigchromatographie-Anlage angewiesen. Außerdem ist die Probenvorbereitung zeitaufwendig.

Wie aus den vorhergehenden Ausführungen zu entnehmen ist, gibt es für die Bestimmung von nichtenzyma-

OS 37 20 736

tisch glycosylierten Proteinen nur eine Methode, die nicht durch interferierende, störende Faktoren beeinflusst wird. Allerdings ist diese Methode mit hohen Investitionen (HPLC-Anlage) verbunden und nicht einfach durchzuführen.

Es ist bekannt, daß substituierte Arylboronsäuren in wäßriger alkalischer Lösung mit nichtenzymatisch glycosylierten Proteinen Boronsäureester bilden. Um die Menge des Boronsäureesters zu bestimmen, wurde bisher Phenylboronsäure an einem Träger kovalent gebunden (Affinitätschromatographie). Nach spezifischer Bindung von nichtenzymatisch glycosylierten Proteinen aus einem Gemisch wurde der Träger gewaschen und die gebundenen Proteine eluiert und quantifiziert. Diese Methode ist sehr teuer, zeitaufwendig und nicht automatisierbar.

Die Erfindung wendet deshalb nun ein anderes Verfahren als die oben erwähnten Methoden an. Zur direkten Bestimmung der Boronsäureester in wässriger alkalischer Lösung setzt man erfindungsgemäß fluorophore oder chromophore Arylboronsäuren ein. Als Chromophor eignen sich vor allem substituierte Phenylboronsäuren, die ein Absorptionsmaximum im langwelligen Bereich (500–600 nm) aufweisen, so daß die Eigenabsorption von Blutplasma oder -serum nicht interferiert. Fluorophorhaltige Arylboronsäuren wie die kommerziell erhältliche Dansylphenylboronsäure sind für die direkte Bestimmung der Boronsäureester im Blutserum oder -plasma nicht geeignet, da diese Körperflüssigkeiten variable, fluoreszenzlöschende Bestandteile enthalten. Aus diesem Grunde werden zur empfindlichen Bestimmung von Serumbestandteilen fluoreszenzmarkierte Substrate verwendet, da mit diesen Konzentrationsbestimmungen über die Änderung der Fluoreszenzpolarisation durchgeführt werden können. Die kommerziell erhältlichen Geräte verwenden das Fluoreszenzspektrum des Fluoreszeins, so daß die jeweiligen markierten Substrate für die Messung in diesen Geräten mit Fluoreszein markiert sein müssen.

Solche fluoro- oder chromophore Arylboronsäuren können in an sich bekannter Weise erhalten werden. Verschiedene Synthesewege sind anschließend beschrieben. Gibt man solche im langwelligen Bereich absorbierenden substituierte Arylboronsäuren im Überschuß zu wässrigen alkalischen Proteinlösungen, so entstehen bei Raumtemperatur innerhalb von Minuten mit den Fruktosylamingruppen der Proteine die Boronsäureester. Da die Esterbildung zur Absorptionsabnahme des langwelligen UV-Maximums führt (Abb. 1), läßt sich die Menge der nichtenzymatisch glycosylierten Proteine über einen Standard, der genauso gemessen wurde, berechnen.

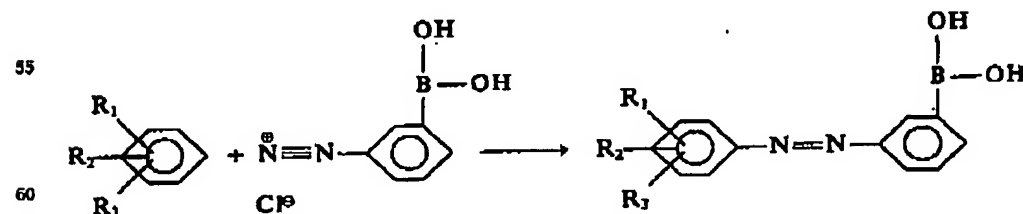
Bei sehr geringem Gehalt an Fruktosylamingruppen empfiehlt es sich die ungebundenen, überschüssigen Boronsäuren abzutrennen z. B. durch Adsorption an Aktivkohle oder andere bekannte Maßnahmen zur Trennung von nieder- und hochmolekularen Substanzen wie Gefiltration oder Filtration durch Nitrocellulosefilter. Die optische Dichte der verbleibenden Lösung ist der in dieser Lösung vorhandenen nichtenzymatisch glycosylierten Proteine proportional und kann ebenfalls über einen bekannten Standard berechnet werden. Die Darstellung und Kalibrierung eines nichtenzymatisch glycosylierten Proteinstandards ist als Beispiel 10 beschrieben.

Vorteile des Meßverfahrens

Die einfache Handhabung erlaubt sowohl eine manuelle als auch eine automatisierte Testdurchführung. Da für die Ausführung außer einem UV-VIS Photometer oder einem Gerät zur Messung der Fluoreszenzpolarisation kein spezielles Gerät erforderlich ist, kann die Methode allgemein angewendet werden. Die auch bei Raumtemperatur rasche Boronsäureesterbildung (meist innerhalb einer Minute abgelaufen) führt zu hohen Analysenzahlen pro Tag. Durch die Verwendung eines Standards, der

1. die Fruktosylaminbindung an Lysin enthält und
2. als Matrix eine Proteinstruktur enthält kann der Test absolut kalibriert werden.

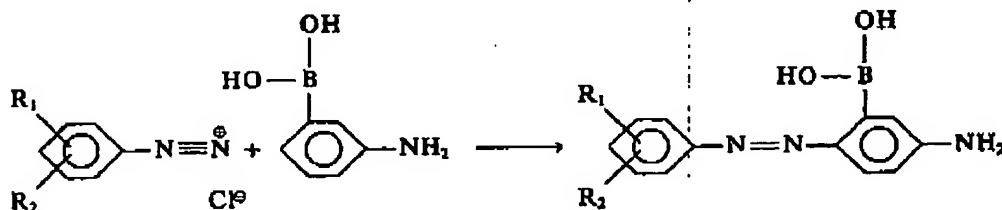
Durch eine parallel ausgeführte Proteinbestimmung läßt sich der Meßwert auf die Proteinmenge beziehen. Die erfindungsgemäßen Arylboronsäuren, die im voranstehend beschriebenen Verfahren eingesetzt werden können, lassen sich mittels verschiedener, prinzipiell bekannter Verfahren herstellen. So läßt sich z. B. durch Kupplung von 3-Diazo-Phenylboronsäure-chlorid mit substituierten aromatischen Phenolen oder Aminen als Kupplungskomponente eine Vielzahl von substituierten Phenylboronsäuren herstellen:



Zur Herstellung wird m-Amino-phenylboronsäure in stark salzsaurer Lösung bei 0°C mit äquimolaren NaNO₂ diazotiert. Nach Beendigung der Reaktion wird das gelöste Diazoniumsalz langsam zu einer alkalischen Lösung getropft, die eine äquimolare Menge des aromatischen Phenols bzw. Amins enthält. Dabei soll die Temperatur zwischen 5–10°C und der pH-Wert über 10 z. B. 10–12, gehalten werden.

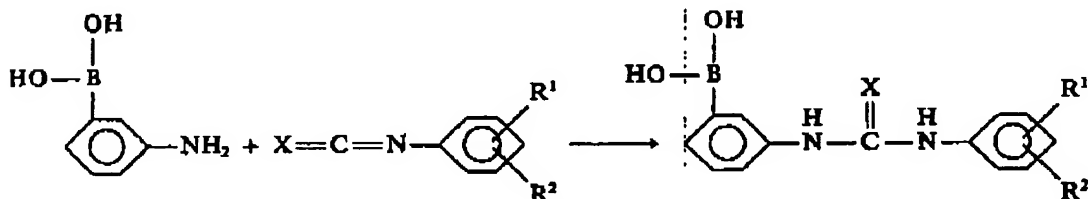
Zur Isolierung wird eine saure Lösung in eine organische Phase extrahiert und das Produkt chromatogra-

phisch gereinigt. Entsprechend läßt sich durch Kupplung von substituierten Aryldiazoniumsalzen mit m-Aminophenylboronsäure eine Vielfalt von unterschiedlich absorbierenden Boronsäurederivaten darstellen:



Zur Darstellung wird das substituierte Diazoniumsalz in Gegenwart einer äquimolaren Menge vom m-Aminophenylboronsäure in Wasser gelöst und bei ca. 20° C geführt. In vielen Fällen erweist sich eine in situ Herstellung des Diazoniumsalzes als Vorteil. Die substituierte Arylboronsäure kann durch präparative Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel gereinigt werden.

Eine andere Möglichkeit zur Darstellung von z. B. substituierten Phenylboronsäuren ist die Reaktion von m-Aminophenylboronsäure mit Carbonylverbindungen (z. B. Isothiocyanaten):



Zur Synthese wird m-Aminophenylboronsäure in alkalischer Na₂CO₃-Lösung gelöst, eine äquimolare Menge Fluoreszeinderivat zugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur geführt. Das Produkt kann über präparative Dünnschichtchromatographie gereinigt werden.

Entsprechend der Bildung der nichtenzymatisch glycosylierten Proteine in vivo (Schema 1) lassen sich definiert glycosylierte lysinhaltige Polyaminosäuren synthetischer oder natürlicher Herkunft (Proteine) darstellen, die zur Kalibrierung geeignet sind. Dazu inkubiert man in wässrigen Pufferlösungen (pH 5–11, insbesondere 7–9) die Polyaminosäure mit D-Glucose bei ca. 37° C 1–5 Tage. Die Reaktion läuft aber sogar bei eingefrorenen Proben, wenn auch sehr langsam ab und kann bis ca. 55° C durchgeführt werden. Sowohl pH- als auch Temperaturerhöhung beschleunigen die Reaktionsgeschwindigkeit. Zur Beendigung der Reaktion wird gegen den gleichen, aber glucosefreien Puffer dialysiert und die Menge an glycosylierter Polyaminosäure bestimmt.

Folgende Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Verfahrens sind möglich:

1. Direkte Bestimmung der spezifisch gebundenen Arylboronsäure ohne Trennung der überschüssigen freien Arylboronsäure.

a) Zugabe von z. B. substituierten Phenylboronsäure zu einer alkalischen Lösung von nichtenzymatisch glycosylierten Proteinen führt zur Borsäureesterbildung, die mit einer Änderung des UV-VIS-Absorptionsspektrums der Phenylboronsäure begleitet ist. Da die Abnahme der Absorption im sichtbaren Bereich dem Glycosylierungsgrad der Serumproteine proportional ist, läßt sich die Spektrumsänderung zur Bestimmung der glycosylierten Serumproteine direkt verwenden.

b) Versetzt man z. B. fluoreszeinsubstituierte Phenylboronsäuren mit alkalischer Lösung von glycosylierten Serumproteinen, so führt die Borsäureesterbildung zu einer Änderung der Fluoreszenzpolarisation, deren Ausmaß vom Glycosylierungsgrad der Serumproteine abhängig ist.

2. Bestimmung der spezifisch gebundenen Arylboronsäure mit Trennung der überschüssigen freien Arylboronsäure.

a) Nach Borsäureesterbildung im alkalischen Milieu wird die überschüssige freie Arylboronsäure schnell abgetrennt (z. B. durch Aktivkohle). Die in wässriger Lösung verbleibende, dem Glycosylierungsgrad der Serumproteine proportionale, proteingebundene Arylboronsäure kann photometrisch bestimmt werden. Selbstverständlich kann auch umgekehrt die spezifisch gebundene Arylboronsäure z. B. durch Fällung abgetrennt und dann bestimmt werden.

b) Für die halbquantitative Bestimmung eignet sich die Abtrennung der freien Arylboronsäuren durch eine proteinabsorbierende Filterschicht (z. B. Nitrocellulose). Die dem Glycosylierungsgrad des Proteins proportionale, proteingebundene, farbige oder fluoreszierende Arylboronsäure wird am Filter gebunden. Die Intensität der Farbe oder der Fluoreszenz kann mit der von bekannten Standardproben verglichen werden. Entsprechend kann das Filter auch über eine wasserabsorbierende Schicht aufgezogen werden, so daß die freien Arylboronsäuren in die unter dem Filter liegende Schicht wandern (Teststreifen).

OS 31 20 150

3. Spezifische Blindwertbildung durch Arylboronsäureester. Zugabe von Borsäure oder substituierten Arylboronsäuren zu alkalischen Lösungen von nichtenzymatisch glycosylierten Proteinen führt zur Borsäureesterbildung. Die so veresterten OH-Gruppen des Fruktosylaminrestes stehen nicht mehr zur Endiolbildung zur Verfügung und zeigen daher keine Reduktionseigenschaften mehr.

Zur Blindwertbildung eignet sich prinzipiell eine Reihe von Substanzen:

1. Borsäure bzw. Arylboronsäuren, die mit glycosylierten Proteinen Borsäureester bilden, aber in der Indikatorreaktion nicht erfaßt werden.
 - a) Reduktionstest (Testprinzip 3)
Boronsäure bzw. Phenylboronsäure bilden mit nichtenzymatisch glycosylierten Proteinen im alkalischen Milieu Boronsäureester. Da nun keine Enolisierung des cis-Diols und damit keine Reduktion des Redoxindicators möglich ist, zeigen glycosylierte Proteine in Gegenwart von Bor- bzw. Phenylboronsäuren keine oder erniedrigte Reduktionseigenschaften. Die verbleibende Reduktionsaktivität, die unter diesen Meßbedingungen nachweisbar ist, ist unspezifischer Natur und kann vom Gesamtwert abgezogen werden. Die Differenz stellt ein Maß für die Glycosylierung dar.
 - b) die als Blindwert verwendete Boronsäure absorbiert nicht im UV-Vis-Bereich, bei dem gemessen wird (z. B. 500–600 nm). Ein ca. 100facher Überschuss dieser Boronsäure verdrängt die chromophorhaltige Boronsäure spezifisch aus der Bindung.
2. Zugabe eines Überschusses an cis-diolhaltigen Verbindungen, die Arylboronsäuren binden, z. B. Fruktose, Sorbit, Diäthanolamin.

Zur Standardisierung der beschriebenen Testverfahren kann humanes Serum Albumin (Behringwerke, Marburg, GFR) mit bekanntem Glycosylierungsgrad verwendet werden, aber auch z. B. Rinderserumalbumin und andere tierische Serumalbumine. Alternativ können lysinhaltige polymere Aminosäuren, die in vitro glycosyliert wurden, zur Standardisierung verwendet werden. Diese polymeren, in vitro glycosylierten Aminosäuren sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung. Die Bestimmung des Glycosylierungsgrades des Standards kann mittels der Furosinmethode oder mit radioaktiv markierter Glucose erfolgen.

Als Untersuchungsmaterial sollte vorzugsweise Serum verwendet werden. Bei der Verwendung von Plasma muß eine Störung der verwendeten Antikoagulanzen ausgeschlossen werden.

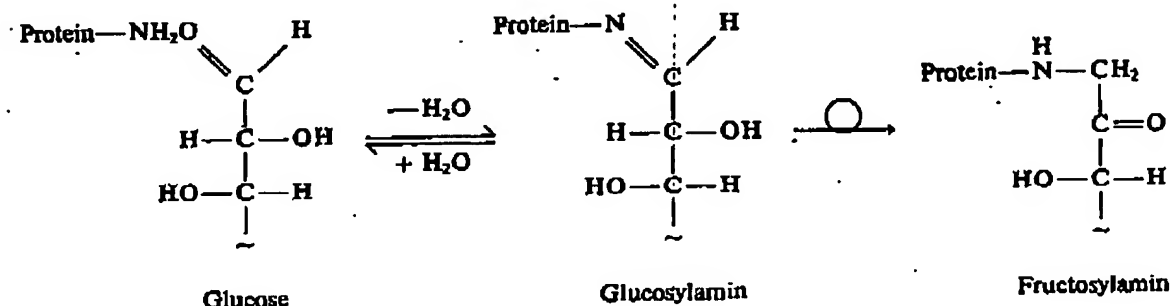
Sollen Gewebeproben gemessen werden, müssen diese chemisch oder enzymatisch in eine lösliche Form gebracht werden.

Hämolyse stört prinzipiell, da das Hämoglobin auch nichtenzymatisch glycosyliert ist und somit mitgemessen wird. Um einen alkalischen pH-Wert im Test zu haben, gibt man am besten Puffer zu. Als Puffer eignen sich z. B. Karbonat-, Glycin- und Tris Puffer im pH-Bereich 8–11 – vorzugsweise zwischen pH=9–9,5 – die die Borsäure oder die substituierte Phenylboronsäure bereits gelöst enthalten. Das so vorgefertigte Reagenz kann direkt zur Probe gegeben werden. Da die Boronsäureesterbildung sehr schnell erfolgt, kann innerhalb von Minuten gemessen werden.

Bei allen Verfahrensvarianten kann evtl. zur Erhöhung der Löslichkeit der Arylboronsäure etwas Tensid, z. B. Tween, zugesetzt werden.

Theoretische Basis der Erfindung

Freie Aminogruppen von Proteinen bilden mit Carbonylverbindungen eine Schiff'sche Base, wobei das Gleichgewicht in wäßriger Lösung stark auf der linken Seite liegt. Enthält die Carbonylverbindung am C-2 eine OH-Gruppe wie z. B. Glucose oder Laktose, so kann sich die Schiff'sche Base in ein Ketosylamin umlagern, wobei die als Amadoriumlagerung bekannte Reaktion im wesentlichen irreversibel ist.

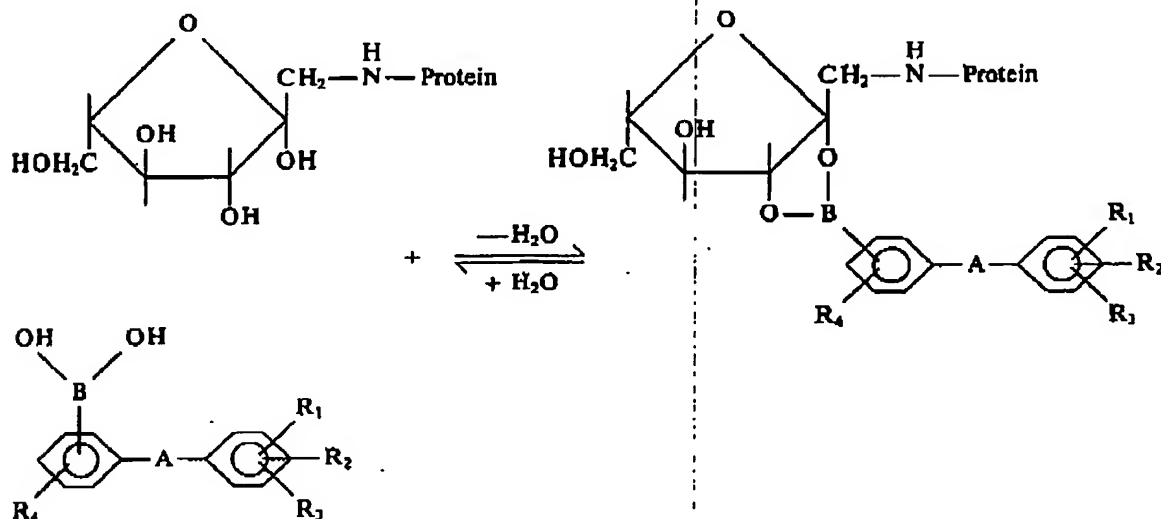


Schema 1

Reaktion einer freien Aminogruppe eines Proteins mit Glucose

Unter physiologischen Bedingungen (i. e. pH=7,4) ist die Menge der proteingebundenen Glucose der mittlere

ren Blutglucosekonzentration proportional und damit für die Beurteilung der Einstellung von Diabetikern geeignet. Die Fruktosylaminylierung, ob frei oder proteingebunden, liegt in wäßriger Lösung in pyranosider und furanosider Ringstruktur vor. In leicht alkalischem Milieu bilden diese aufgrund ihrer cis-diolständigen OH-Gruppen sehr schnell Borsäureester mit Borsäure oder substituierten Phenylboronsäuren.



Schema 2

Allgemeine Reaktionsgleichung der Borsäureesterbildung

Im einzelnen läßt sich die klinische Bedeutung der Bestimmung von glycosylierten Serumproteinen (GSP) folgendermaßen zusammenfassen:

1. Messung der GSP mit Hilfe von Borsäureestern stellt eine quantitative Bestimmung der nichtenzymatisch gebundenen Glucose von Serumproteinen dar, wobei das Albumin zu ca. 80% beiträgt; d. h., die Plasma-halbwertszeit entspricht etwa der des Albumins von ca. 20 Tagen.
2. GSP korreliert mit dem Nüchternblutzucker und mit glycosyliertem Hämoglobin. Der momentane Blutglucosespiegel beeinflusst den GSP-Wert zur Zeit der Probennahme nicht. So sind z. B. Ernährung, körperliche Aktivität und Zeitpunkt der Probennahme ohne Einfluß auf den GSP-Wert. Die GSP-Bestimmung stellt somit einen Index für die Stoffwechseleinstellung von Diabetikern dar.
3. Die GSP-Bestimmung ist als Screening-Test geeignet, um Personen mit manifesten Diabetes zu entdecken.
4. Je nach Durchführung des Tests ist eine Automatisierung möglich.
5. Die GSP-Bestimmung ist spezifisch für die Ketoaminform; die Aldiminform und freie Glucose beeinflussen das Ergebnis nicht.

Die Erfindung wird anhand der folgenden Beispiele näher erläutert.

Beispiel 1

Bestimmung von GSP ohne Trennung der freien substituierten Arylboronsäuren

0,1 ml Probe (ca. 3–7 mg Protein) wird zu 1 ml Reagenz gegeben. Das Reagenz enthält 20 $\mu\text{Mol/l}$ Azo 9, das in 0,1 M Glycinpuffer 0,1 M MgCl_2 pH=9,2 gelöst ist. Die Extinktionsänderung wird im Bereich 540–600 nm z. B. bei 546 oder 578 nm abgelesen. Als Blindwert dient 0,1 ml einer NaBH_4 reduzierten Probe, die genauso gemessen wird.

Der absolute Wert wird über einen bekannten Standard, der wie eine Probe gemessen wurde, berechnet.

Beispiel 2

Bestimmung von GSP mit Abtrennung der freien substituierten Arylboronsäuren

0,1 ml Probe (ca. 3–7 mg Protein) werden zu 0,5 ml Reagenz gegeben. Das Reagenz besteht aus einer frisch bereiteten Lösung von 0,1 mMol/l Azo 9 in 0,1 M Glycinpuffer 0,1 M MgCl_2 pH=9,2. Zur Blindwertermittlung wird 0,1 ml Probe zu 1 ml Blindwertreagenz gegeben, wobei das Blindwertreagenz aus der Reagentienlösung durch Zugabe von 25 mMol/l Ammoniumpentaborat erhalten wird. Nach 10 Minuten werden 0,5 ml Kohle-Dex-

OS 37 20 736

transuspension zugegeben und 2 Minuten geschüttelt. Dann wird rasch zentrifugiert — 1 Minute bei ca. 10 000 g — und die Absorption des Überstandes bei 546 oder 578 nm bestimmt. Die Kalibrierung erfolgt mit Hilfe eines bekannten Standards, der genauso gemessen wurde.

Alle Arbeitsschritte können bei Raumtemperatur durchgeführt werden.

Beispiel 3

Entsprechend der Vorschrift von Beispiel 2 kann der Test auch mit Azo 5 durchgeführt werden. Dabei enthält das Reagenz bzw. das Blindwertreagenz 0,1 mMol/l Azo 5 statt Azo 9. Die Absorption wird bei 546 nm abgelesen und wie oben beschrieben kalibriert.

Beispiel 4

Spezifische Blindwerthildung mit Borsäure und 3-Nitro-Phenylboronsäure

0,1 ml Probe (ca. 3—7 mg Protein) wird bei 37°C zu 1 ml Carbonatpuffer (0,1 Mol/l; pH=10,3), der 0,25 mMol/l Nitrobluetetrazoliumsatz enthält, gegeben und die Absorption bei 530 nm nach 10 und 15 Minuten gemessen und der Extinktionsunterschied berechnet. Für die Blindwertermittlung wird genauso verfahren, nur enthält das Blindwertreagenz zusätzlich 0,15 Mol/l Natriumborat oder 30 mMol/l 3-Nitrophenylboronsäure. Die Differenz von Haupt- und Blindwert wird mit der eines bekannten Standards verglichen, der genauso gemessen wurde.

Berechnung:

$$\frac{(A^{15'} - A^{10'})}{(A^{15'} - A^{10'})} \times \text{Standard (nMol/mg)} = \text{Probe (nMol/mg)}$$

Pipettierschema:

	Serum	Reagenz	Serum	Blindwertreagenz
Hauptwert	0,1 ml	1,0 ml		
Blindwert			0,1 ml	1,0 ml

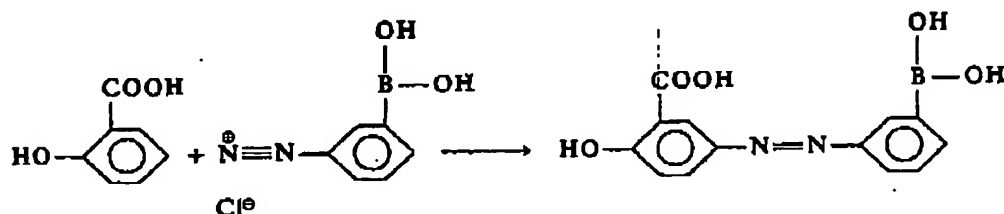
Beispiel 5

Halbquantitative Bestimmung des Glycosylierungsgrades von Proteinen

0,02 ml Probe (ca. 0,5—1,5 mg Protein) werden mit 0,1 ml Reagenz bei Raumtemperatur vermischt. Das Reagenz besteht aus einer Lösung von 0,02 mM fluoreszenzmarkierter Arylboronsäure (Darstellung Beispiel 9) in 0,1 M Glycinpuffer 0,1 M MgCl₂ pH=9,2. Nach 5 Minuten wird die Probe durch ein Nitrocellulosefilter (Ø=3 cm) gesaugt und das Filter zwei Mal gewaschen. Dann werden die Filterplättchen unter UV-Licht mit zwei mitgeführten Standardproben verglichen. Je nach Fluoreszenzintensität kann die Probe der ersten Standardprobe (entspricht Normalserum) oder der zweiten (entspricht Diabetikerserum) zugeordnet werden.

Beispiel 6

Darstellung von 4'-Hydroxy-3'-carboxy-phenyl-diazophenyl-3-boronsäure (Azo 5)



20 mMol m-Amino-phenylboronsäure (Fa. Sigma, Taufkirchen GFR) werden in 55 ml 3 N HCl gelöst und die Lösung auf 0°C gekühlt. Langsam und unter Rühren werden 8 ml einer 2,5 M NaNO₂ Lösung zugetropft, wobei die Temperatur der Reaktionslösung unter 5°C bleiben sollte. Es wird soviel NaNO₂-Lösung zugegeben, bis Nitrit noch 5 Minuten in der Lösung nachweisbar ist. Überschüssige HNO₂ wird durch Zugabe von wenig Harnstoff beseitigt. Ein brauner Niederschlag wird abzentrifugiert.

Zu einer Lösung von 20 mMol Salicylsäure in 30 ml 2N NaOH läßt man langsam obige Lösung zufließen und die Temperatur wird zwischen 5 und 10°C gehalten. Der pH-Wert sollte nicht unter 10 sinken, sonst wird mit 2 N

US 31 20 150

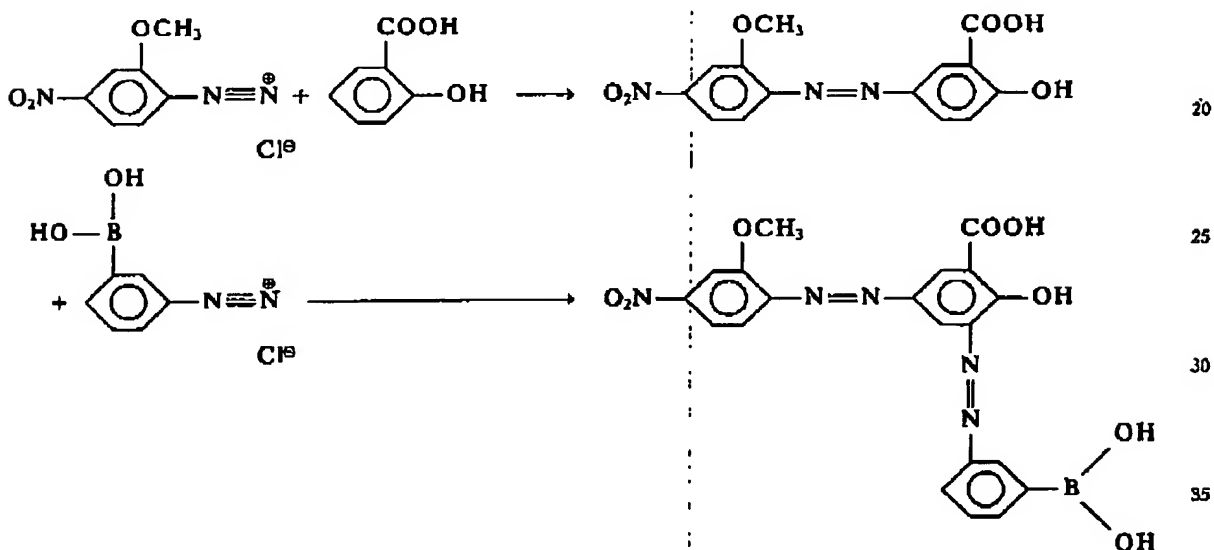
NaOH nachgestellt.

Nach Beendigung der Reaktion wird mit 6 N HCl auf pH = 1–2 angesäuert und mit Diethylether extrahiert. Das nach Abziehen des Lösungsmittels erhaltene Produkt wird in 0,1 M TRIS/HCl-Puffer pH 8,5 gelöst und auf eine DEAE-Cellulose-Säule (DE 52) (mit TRIS-Puffer pH 8,5 equilibriert) gegeben. Während der Elution mit demselben Puffer wird die zweite rote Bande gesammelt. Zur Gewinnung des reinen Farbstoffes wird erneut angesäuert, mit Ether extrahiert, die Ether-Phase über Na_2SO_4 getrocknet und zur Trockne eingedunstet. Bei Chromatographie auf Kieselgel G-60 Dünnschicht-Platten mit dem Fließmittel n-Propanol : H_2O : NH_3 (25%) = 30 : 10 : 10 erscheint die Substanz bei einem Rf-Wert von ca. 0,5. Ausbeute ca. 50%.

Nach der gleichen Arbeitsweise, jedoch mit 1-Amino-8-naphthol-3,6-disulfonsäure statt Salicylsäure wurde die entsprechende Naphtylverbindung erhalten.

Beispiel 7

Darstellung einer Bis-Diazophenylboronsäure (Azo 9)



0,1 mMol Diazo-4 Nitro-o-anisidin wird in wenig H_2O gelöst und langsam bei ca. 10°C zu einer Lösung von 0,1 mMol Salicylsäure in 0,3 mMol NaOH gegeben. Der pH-Wert wird während der Reaktion geprüft und soll nicht kleiner als 10 werden. Man rührt das Reaktionsgemisch ca. 30 min bei 10°C (Lösung A).

0,1 mMol m-Amino-phenylboronsäure werden wie für Beispiel 6 beschrieben diazotiert.

Nach Zentrifugation wird die klare, gelb gefärbte Lösung langsam zu Lösung A gegeben (10°C), wobei durch Zugabe von 2 N NaOH die Mischung stets deutlich alkalisch (pH > 10) gehalten wird.

Nach einer Reaktionszeit von 30 min wird angesäuert (pH 1–2) und der entstandene Niederschlag abzentrifugiert. Das Präzipitat wird in wenig NaOH gelöst, verdünnt, mit etwas Na-acetat versetzt und mit Eisessig auf pH 4,5 gebracht, so daß sich noch kein Niederschlag bildet. Aus dieser schwachsauren Lösung wird der Farbstoff an Polyamid-6-Pulver (Serva, Heidelberg) adsorbiert. Man wäscht mit 0,1 M Acetat-Puffer pH 4,5 und mit wenig H_2O . Mit Methanol (100%) wird der gewünschte Farbstoff weitgehend spezifisch eluiert.

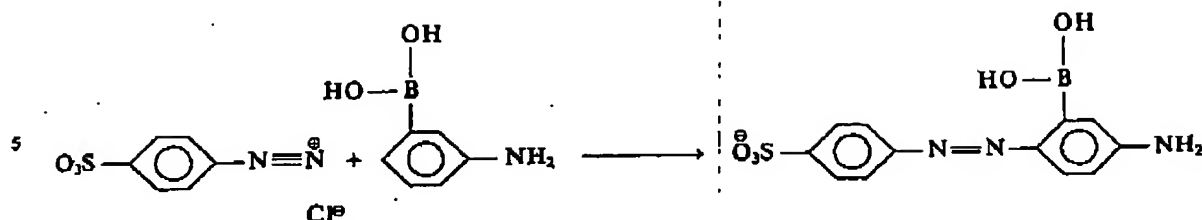
Eine weitere Reinigung kann durch Adsorptionschromatographie an Al_2O_3 basisch (Type WB-2) (Fa. Sigma) durchgeführt werden:

Der in Diethylether gelöste Farbstoff wird auf eine Säule mit Al_2O_3 (equilibriert mit Ether) gegeben. Man wäscht zuerst mit Ether, dann mit Isopropanol. Das Titelprodukt wird mit Methanol eluiert. Die Synthese kann ebenso wie die Reinigung durch DC auf Cellulose-Platten mit n-Propanol : H_2O : NH_3 (25%) = 30 : 10 : 10 als Fließmittel überprüft werden. Rf-Wert = 0,35.

Beispiel 8

Darstellung von 4'-Sulfonat-phenyl-diazophenyl-4-amino-2-boronsäure (Azo 2)

OS 37 20 736



83,7 mg Sulfanilsäure und 50 mg m-Amino-phenylboronsäure werden in 420 µl H₂O suspendiert und unter Rühren tropfenweise NaNO₂ Lösung (33,7 mg/420 µl H₂O) bei Raumtemperatur zugegeben. Nach Ende der NaNO₂ Zugabe wird noch 1 Stunde gerührt. Dann wird 1 ml Ethanol zugegeben und die Reaktionslösung auf präparativen Dünnschicht-Platten (Kieselgel G 60) aufgetragen und in Ethanol: H₂O = 60 : 40 entwickelt. Neben einer schnell wandernden gelben Bande erscheint bei R_f ~ 0,5 die weinrote Bande von Azo 2, die mit einer Mischung von Äthanol: H₂O = 50 : 50 eluiert werden kann.

Beispiel 9

Darstellung von fluoreszenzmarkierter Phenylboronsäure

0,5 mMol Fluoresceinisothiocyanat p.A. werden in 50 ml 50 mM Na₂CO₃ pH=9 gelöst und zu 20 ml einer Lösung von 0,5 mMol m-Aminophenylboronsäure in 50 mM Na₂CO₃ pH=9 getropft und bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Nach Ansäuern auf pH=3 läßt sich das Produkt mit Ethylacetat extrahieren und auf präparativen Dünnschicht-Platten (Kieselgel G 60) reinigen. Fließmittel: Aceton : Ethylacetat-5 : 1 R_f=0,6.

Beispiel 10

Darstellung von definiert glycosylierten Proteinen bzw. Polyaminosäuren

400 mg humanes Serumalbumin werden in 10 ml Kaliumphosphatpuffer (10 mM; pH=7,4), der 140 mMol/l NaCl enthält, gelöst und 20 mMol/l D-Glucose und 3 mMol/l NaN₃ zugegeben. Die Lösung wird bei 37°C 1-5 Tage inkubiert und anschließend gegen glucosefreien Inkubationspuffer mindestens 48 Stunden dialysiert. Der Standard wird anschließend mit der bekannten Furosäuremethode kalibriert. Unter diesen Bedingungen werden 1,2 nMol Glucose je mg Albumin pro Tag eingebaut. Anstelle von humanem Serumalbumin lassen sich auch tierische Serumalbumine oder synthetische lysinhaltige Polymere wie Poly-D-Lysin, Poly (D-Glutamat, D-Lysin) 6 : 4 oder Poly (Glutamat, Lysin, Tyrosin) 6 : 3 : 1 vom Molekulargewichtsbereich 30-150 kD unter den beschriebenen Bedingungen glycosylieren und gemäß Schleicher E. und Wieland O. H. (J.Clin.Chem.Clin.Biochem. 1981, 19, 81-87) analysieren.

Das Verfahren und die bevorzugte Verfahrensvarianten werden im folgenden zusammengefaßt, wobei der Ausdruck "färbende Borsäure" eine Arylboronsäure bedeutet, die im UV-Vis-Bereich ein Absorptionsmaximum hat oder fluoreszenzmarkiert ist und deren Fluoreszenzpolarisation sich bei der Bindung an die glycosylierten Proteine ändert.

Das Grundverfahren besteht in der Bestimmung der glycosylierten Proteine durch färbende Borsäuren. Dies kann auch auf Filterpapier erfolgen. Dies ergibt einen Hauptwert A 1, der für bestimmte Reihenuntersuchungen oder Screeningtests genügen kann.

Davon abgezogen wird der Blindwert A 2, der an einer identischen Probe mit einer a) nichtfärbenden Borsäure oder an einer b) mit Boranat reduzierten Probe mit einer färbenden Borsäure oder c) statt Borsäure bzw. Borsäurederivat mit einem Überschuß an cis-Diol bildender Verbindung gebildet wird.

Der Differenzwert A 1 minus A 2 ist die spezifische Absorption oder Fluoreszenz für die Glycosylierung.

Zur Absolutwertbildung wird die gleiche Arbeitsweise wie für A 1 genannt mit einem Standard mit bekanntem Glucosegehalt durchgeführt, was den Wert ST 1 ergibt.

Davon abgezogen wird der Wert ST 2 der Standardprobe, die ebenso behandelt wird, wie oben für A 2 beschrieben.

Der Differenzwert ST 1 minus ST 2 ist die Kalibrierung oder Standardisierung.

Der Wert ΔA : ΔST verhält sich wie die gesamte Menge an glycosyliertem Protein zum kalibrierten Standard, was einen Absolutwert ergibt (ΔA : ΔST = Gesamtmenge : Standard).

Durch Blindwertbildung, für welche Elementenschutz begehrt wird, kann man auch beim unspezifischen Reduktionstest, der einen unspezifischen Hauptwert ergibt, durch Differenzbildung bei Durchführung des gleichen unspezifischen Reduktionstestes mit z. B. 3-Nitrophenylboronsäure zur Blindwertbildung und Differenzbildung einen spezifischen Wert erhalten.

Besonders interessant ist die Möglichkeit, die Bestimmung auf Filterpapier (Nitrocellulosefilter) durchzuführen, die man mit Standards vergleichen kann, um so schnell einen verhältnismäßig guten Überblick bei einem großen Patientenkollektiv zu erzielen.

Die Erfindung ermöglicht somit die Bestimmung von glycosyliertem Protein mit substituierten Arylboronsäuren (im Überschuß) durch die Bestimmung des gebildeten Borsäureesters. Dabei kann der Anteil des gebundenen Borsäureesters gemessen werden. Die Trennung freier und gebundener Borsäureester kann z. B. erfolgen mit Koble oder Filterpapierteststreifen oder direkt über die Änderung des UV-Vis-Spektrums oder die Ände-

ung der Fluoreszenzpolarisation.

Die Blindwertbildung kann erfolgen durch Überschuß an cis-Diol enthaltender Verbindung oder mit einer mit Boronat reduzierten Probe oder Umsetzung mit nicht färbenden Borsäuren. Die Standardisierung ist möglich über natürliche oder lysinhaltige polymere Aminosäuren oder Peptide die definiert glycosyliert sind.

Das Verfahren ist nicht nur auf glucosylierte Proteine anwendbar, sondern in gleicher Weise auf alle nichtenzymatisch verzuckerten Proteine, z. B. laktosylierte Proteine, um z. B. die Erhitzungsbedingungen beim Pasteurisieren von Milch oder der Herstellung von Kondensmilch zu überprüfen, da sich hier Laktoselysin bildet, so daß dieses Lysin metabolisch beim Säugetier nicht mehr verwertbar ist.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

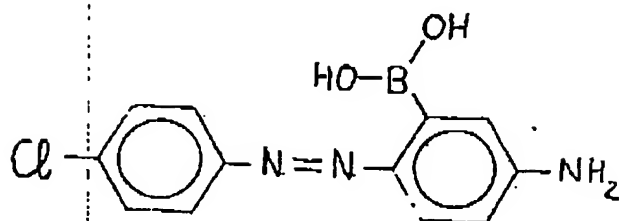
60

65

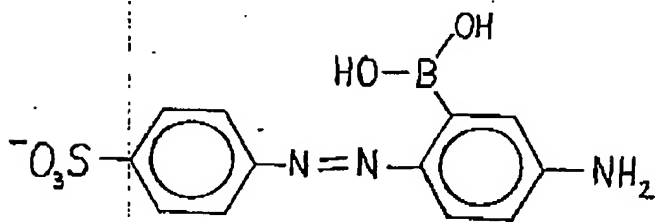
2005-07

3720736

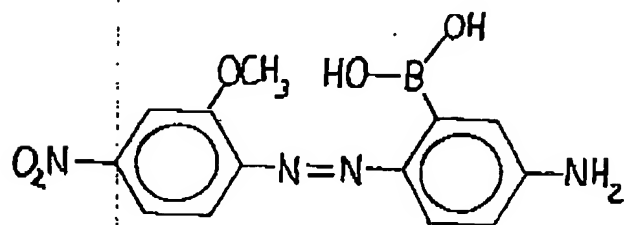
Azo 1



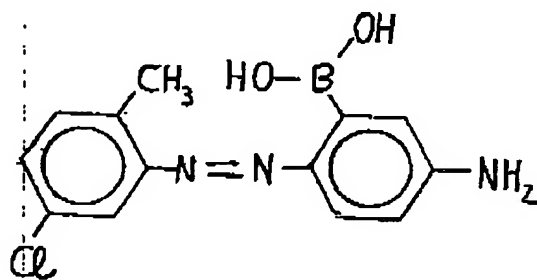
Azo 2



Azo 3



Azo 4



Azo 5

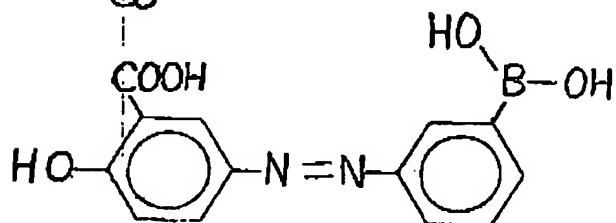
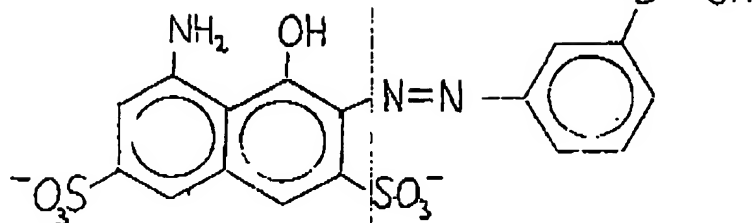


Abb. 2

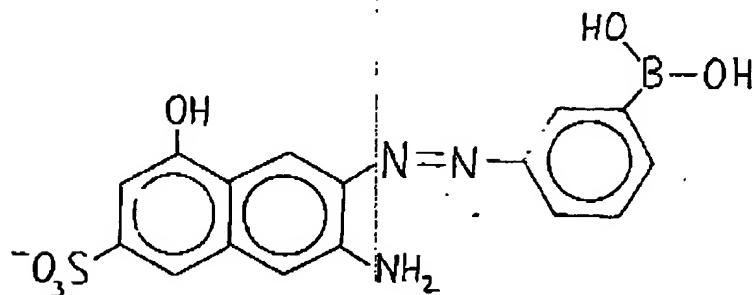
Strukturformeln der Diazoverbindungen Azo 1-5

3720736

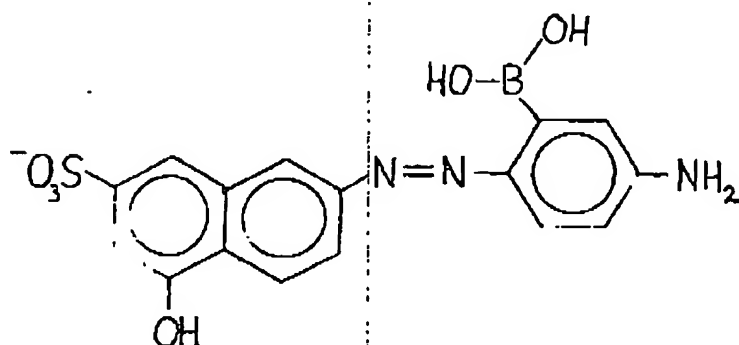
Azo 6



Azo 7



Azo 8



Azo 9

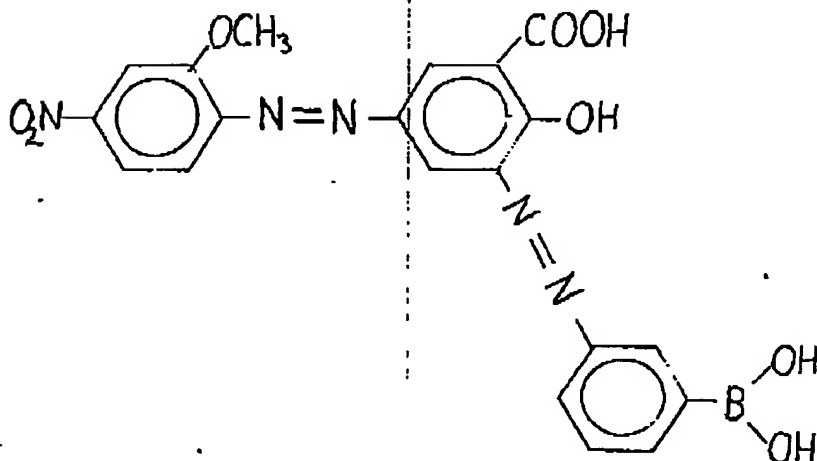


Abb. 3

Strukturformeln der Diazoverbindungen Azo 6-9

Nummer:

Int. Cl.4:

Anmeldetag:

Offenlegungstag:

C 07 F 5/02

23. Juni 1987

5. Januar 1989

20

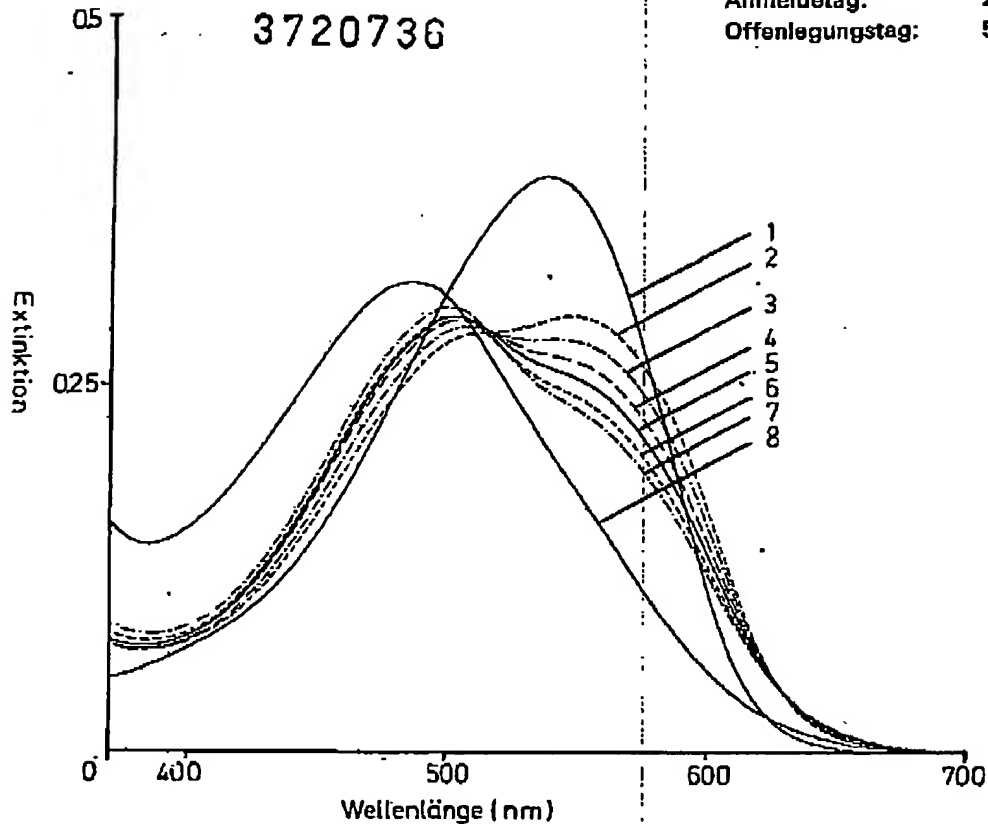


Abb. 1

Änderung der UV-Vis Absorption von Azo 9 in Abhängigkeit vom Glycosylierungsgrad der Serumalbumins. Die Meßlösung in der Kuvette enthält 13,4 $\mu\text{Mol/l}$ Azo 9 und 5,6 mg humanes Serumalbumin, das in vitro unterschiedlich lange glycosyliert wurde (2 - 7), in 0,5 ml 50 mM Glycinpuffer $\text{pH}=8,2$ gelöst.

1 = Lösung ohne Albumin

2-7=Lösung mit glycosyliertem Albumin (2,2-15,7 μMol Lys-glu/mg)

8 = Lösung ohne Albumin + Fruktoseüberschuß (> 100fach)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.